

Elektrophoretische Isoenzym-Auftrennungen der Lactatdehydrogenase im Agargel

Von CHR. FRÖHLICH

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Direktor: Prof. Dr. H. E. Bock)

(Eingegangen am 13. Oktober 1964)

Es wird eine Agargel-Elektrophorese zur Auftrennung der LDH-Isoenzyme beschrieben, die auf Arbeiten von WIEME zurückgeht. Bei Benutzung einer LKB-Immunelektrophorese-Einrichtung können bis zu 18 Untersuchungen gleichzeitig vorgenommen werden. Wegen der verhältnismäßig wenig kostspieligen und unkomplizierten apparativen Einrichtung und der guten qualitativen Auswertbarkeit der Elektrophoresebanden ist die Methode für klinische Untersuchungen geeignet. Eine Begrenzung der diagnostischen Aussagefähigkeit des Verfahrens ergibt sich aus der Gleichartigkeit der im Serum auftretenden LDH-Isoenzym-Muster bei Erkrankungen verschiedener Organe. Eine Zuordnung der im Hitzeinaktivierungsverfahren gewonnenen LDH-Fractionen zu elektrophoretischen Enzymfraktionen ist nicht sicher möglich.

A method is described for the separation of LDH-isoenzymes by agar gel electrophoresis, based on the work of WIEME. With a LKB-immunoelectrophoresis apparatus, at least eighteen determinations can be carried out simultaneously. The method is suitable for clinical investigation, because the apparatus is relatively cheap and simple and the electrophoresis bands give a good qualitative determination. Use of the method for diagnosis is limited since the serum-LDH enzyme pattern is the same for illnesses of different organs. Correlation of LDH-fractions from the heat inactivation method with those from the electrophoretic separation is uncertain.

Seitdem MEISTER 1950 (1) erstmals elektrophoretisch die *Heterogenität* der Lactatdehydrogenase (LDH) in Organextrakten feststellte und später insbesondere VESELL und BEARN (2) dieselbe Beobachtung an der Serum-LDH machten, ist dieses Phänomen von verschiedenen Untersuchern auch unter Anwendung sehr differenter Methoden reproduziert worden. — Inzwischen liegen eine ganze Reihe von Arbeiten vor, die sich mit der Auftrennung der Organ-LDH und den theoretischen Aspekten der Ferment-Heterogenität befassen (3, 4, 5). Es ist jedoch anzunehmen, daß die Enzymfraktionierung als Hilfsmittel der klinischen Diagnostik noch nicht voll ausgeschöpft ist. Arbeiten von vorwiegend klinischem Charakter liegen bisher vor von RICHTERICH und Mitarbeitern (6), die die Serum-LDH von Patienten mit verschiedensten Erkrankungen elektrophoretisch im Stärkeblock auftrennten. Vom gleichen Arbeitskreis (7) wurden LDH-Isoenzym-Auftrennungen auch in Trans- bzw. Exsudaten verschiedener Genese veröffentlicht. Über eine große Zahl, wenn auch klinisch noch weiter gestreuten Untersuchungsmaterials haben DUBACH und VARIOKOJIS berichtet. Sie benutzten zur Bestimmung der LDH-Isoenzym-spektren die Hitzeinaktivierungsmethode, die jedoch nur eine Auftrennung in 2 Isoenzymfraktionen erlaubt, eine hitzestabile und eine hitzelabile. Diese Fraktionen sind mit den sonst üblichen elektrophoretischen Isoenzym-Fractionen nur begrenzt vergleichbar. Mit der gleichen Methode wurde von ihnen auch die Möglichkeit einer genaueren Differenzierung des Myocardinfarkts von anderen Erkrankungen, wie Angina pectoris, Lungenembolie u. a. durch LDH-Isoenzym-Bestimmungen untersucht (9). Auf ein umfangreiches klinisches Material stützen sich die vor kurzem veröffentlichten Untersuchungsbefunde von WOERNER (10). Methodisch verwandte er eine Folien-

Hochspannungs-Elektrophorese. WOERNER betont aufgrund seiner Befunde die Bedeutung der LDH-Isoenzym-Bestimmung zur Klärung der Hyperbilirubinämie sowie — ähnlich den Ergebnissen DUBACH's — zur Spätdiagnose des Herzinfarktes. Interessante vergleichende Untersuchungen der Gewebs- und Serum-LDH-Zusammensetzung sowie Studien über quantitative und qualitative Serum-LDH-Veränderungen bei Reifungsstörungen der erythrozytären Reihe und hämolytischen Erkrankungen wurden von HESS (11, 12) mitgeteilt. — Eine Anzahl weiterer Arbeiten beschäftigt sich hauptsächlich mit Details der Auftrennmethodik oder erörtert richtungsweisende Einzelbefunde (13 bis 23).

Statistisch gesichertes Material, auf das sich eine klinische Diagnostik im Einzelfall stützen könnte, liegt nur in beschränktem Umfang vor. Wir kennen zwar die wesentlichen im Patienten-Serum auftretenden LDH-Isoenzym-muster, wissen jedoch noch ungenügend über die Gesetzmäßigkeiten ihres Auftretens und damit über die Dignität des Einzelbefundes. Dies dürfte seine hauptsächlichliche Ursache im apparativen und zeitlichen Aufwand der bislang beschriebenen Bestimmungsverfahren haben, wie z. B. Stärkeblock-, Stärke-Gel-, Hochspannungs-Elektrophorese, Säulenchromatographie, immunologische Methoden, Prüfung der Hemmbarkeit durch verschiedene DPN-Analoga, Messung der pH-Optima und andere mehr. Eine Ausnahme macht die Hitze-Inaktivierungsmethode und m. E. das Absorptionsverfahren an Zellulose. Beide Methoden erlauben, wie oben erwähnt, nur eine Auftrennung in 2 Fraktionen. Für orientierende Untersuchungen dürften sie in den meisten Fällen ausreichend sein. Sicher werden jedoch bei ihrer Anwendung Spektren mit einer Erhöhung der mittelschnell wandernden Fraktionen, wie sie bei Bluterkrankungen zu beobachten sind, nicht

genügend scharf erfaßt. Auch weitere Differenzierungsmöglichkeiten, die sich aus einer 5-fach Fraktionierung ergeben, gehen bei ihnen verloren. Dieser Umstand dürfte noch insofern nachteilig ins Gewicht fallen, als die Bedeutung der einzelnen Isoenzymfraktionen für die Diagnostik vermutlich noch nicht voll bekannt ist. Um daher mit geringem technischen Aufwand ein möglichst großes Untersuchungsmaterial mit voller Fraktionierung zu erhalten, haben wir die vom Arbeitskreis WIEME in Isoenzym-Untersuchungen eingeführte Agar-Gel-Elektrophorese in der Weise variiert, daß damit in einem Arbeitsgang 18 Einzeluntersuchungen vorgenommen werden können. Als Elektrophorese-Apparatur benutzen wir die zur Durchführung der Routine-Immunelektrophoresen übliche „LKB“-Einrichtung (Fa. Colora-Meßtechnik, Lorch/Württemberg).

Methode

Eine 1-proz. Agarlösung wird in Veronal-Natrium/Barbitursäure-Puffer (pH = 8,8; Ionenstärke = 0,06 μ) hergestellt. Der Agar wird in üblicher Weise verflüssigt. Mit der noch heißen Agarlösung werden Objektträger (25 \times 75 mm) mit 2 ml/ bedeckt. Bei Benutzung der „LKB“-Immunelektrophoreserahmen kann dies für jeweils 3 Objektträger in einem Arbeitsgang erfolgen. Nach Erkalten wird in dem Agar-Gel zum Auftrag des Serums eine Vertiefung von 1,5 cm Länge quer zum Längsdurchmesser des Objektträgers und etwa 3 cm von seinem rechten Rand entfernt angelegt. Zur Elektrophorese wird der oben erwähnte Veronal-Natrium-Barbitursäure-Puffer verwandt. Die elektrophoretische Laufzeit beträgt durchschnittlich 140 Min. bei 250 Volt und 28 mAmpère. Der Fortgang der elektrophoretischen Wanderung kann an einem Objektträger kontrolliert werden, auf dem mit Kongorot angereichertes Serum wandert. Die genügende Wanderungsweite wird an der zurückgelegten Strecke der so markierten Albumine abgelesen. Nach Abschluß der Elektrophorese werden die Objektträger mit folgender Substratlösung bedeckt:

Natriumlactat	(1 m)	15 ml
Phenacine methosulfat	(2 mg/ml)	15 ml
Natriumcyanid	(0,1 m)	15 ml
Nitro-blau-tetrazolium	(5 mg/ml)	15 ml
Phosphat-Puffer pH 6.0	(0,1 m)	25 ml
DPN		50 mg
Aqua dest.		80 ml

Zur Anfärbung der LDH-Fractionen macht man sich deren enzymatische Fähigkeit in der Weise zunutze, daß dem Enzym in der Färbelösung ein Überschuß Lactat angeboten wird, das zu Pyruvat oxydiert wird, wobei der Wasserstoff über eine Reihe von Zwischenträgern auf ein oxydiertes Tetrazoliumsalz übertragen wird. Dessen Reduktion führt zum Ausfall eines wasserunlöslichen, blaufärbten Salzes.

Die Inkubation muß bei einer durchschnittlichen Dauer von 50 Min. in Dunkelheit und bei 37° erfolgen. An-

schließend werden die Agar-Gel-Streifen auf den Objektträgern im Wärmeofen bei 40° getrocknet. Die endgültige Auswertung des Enzym-Elektropherogramms nehmen wir mit dem Zeiss-Extinktions-Schreiber II vor.

Im folgenden seien einige der mit dieser Methodik gewonnenen klinischen Untersuchungen aufgeführt. — Zur Reproduzierbarkeitsprüfung wurde ein Serum mit einer mäßigen Erhöhung der kathodisch wandernden Fraktionen IV und V benutzt, um die schwierige Abtrennung der LDH IV von der LDH V-Fraktion besser beobachten zu können¹⁾.

Tab. 1

Reproduzierbarkeitsprüfung der Methode nach $s = \sqrt{\frac{\sum(x_1 - \bar{x})^2}{n}}$.

20 LDH-Auftrennungen des gleichen Serums im Agargel. Im Gegensatz zu den übrigen in der Arbeit geschilderten Untersuchungen war in den zu dieser methodischen Prüfung notwendigen Auftrennungen ein Elektrophoresepuffer der Ionenstärke 0,24 benutzt worden

Lfd. Nr.	LDH-Isoenzymfraktionen				
	Werte in relativen Prozenten				
	I	II	III	IV	V
1	22	34	34	8	2
2	17	32	39	10	2
3	21	34	34	8	3
4	22	33	35	8	2
5	22	33	33	9	3
6	22	34	33	8	3
7	19	31	41	7	2
8	16	26	43	11	4
9	18	30	37	12	3
10	21	34	39	5	1
11	16	34	36	12	2
12	16	35	41	6	2
13	17	28	40	11	4
14	16	34	41	8	1
15	22	35	37	5	1
16	20	33	37	8	2
17	15	36	38	9	2
18	16	34	38	10	2
19	17	32	39	10	2
20	18	30	36	10	6
\bar{x}	18,7	32,6	37,6	8,8	2,5
s	2,5	2,4	2,8	2	1,2

Zum Beispiel des in Abbildung 1 abgebildeten Isoenzym-Musters im Normalserum muß erwähnt werden, daß die LDH-V-Fraktion nicht in jedem Serum wie hier nachweisbar ist. In dem von RICHTERICH angewendeten Elutionsverfahren (7) wird die LDH IV und LDH V in einer Komponente, der sogenannten „Gamma-LDH“ zusammengefaßt. In den Verfahren, die nach der Elektrophorese den DPNH-Abfall in einer aufgelegten Kontrollplatte mit einer Substratmischung messen (16, 17, 18) und in Färbefahren, wie später auch WIEME (19) und wir es benutzen,

¹⁾ Von den unter üblichen Bedingungen erhaltenen 21 Auftrennungen war 1 Elektropherogramm technisch mißlungen und wurde nicht berücksichtigt.



Normal-Serum



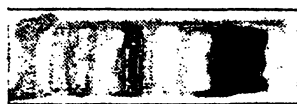
haemolytische Anaemie



Myocardinfarkt



myeloische Leukaemie

Colon-Carcinom
Lebermetastasen?

toxischer Leberschaden

Abb. 1



Normalserum



Myocardinfarkt



Haemolytische Anaemie



Akute toxische Anurie

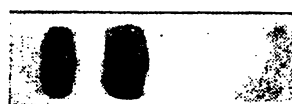
Neoplastische Durchwucherung
des Herzmuskels

Abb. 2

wechselt die Stärke der LDH-V-Fraktion bei Normalpersonen zwischen 0—12%.

Das starke Hervortreten der kathodisch wandernden Fraktionen, insbesondere der LDH-V-Fraktion bei akuten *Leberaffektionen*, ist regelmäßig anzutreffen und konnte auch experimentell durch Tetrachlorkohlenstoff-Vergiftungen bei Affen gesichert werden (16). In unserem Fall stammt das Serum von einer Patientin mit Knollenblätterpilz-Vergiftung bei gleichzeitiger Gesamt-LDH-Aktivität im Serum von 3420 IE/ml.

Am widersprüchlichsten sind die Befunde der LDH-Isoenzymuntersuchungen bei *Neoplasien*. Von allen Untersuchern wird die Regellosigkeit der Spektren bei diesen Erkrankungen hervorgehoben. Auch die Abhängigkeit des Musters vom Sitz des Primärtumors oder vom Ausmaß der Metastasierung konnte bisher nicht sicher erwiesen werden (6, 10). — Gerade die Untersuchungen auf diesem Gebiet dürften jedoch noch zu lückenhaft sein, um ein abschließendes Urteil über den Wert von LDH-Isoenzymbestimmungen im Serum bei der Tumor-Diagnostik abgeben zu können.

Eine erhebliche Schwierigkeit in der Deutung der LDH-Isoenzym-Spektren besteht in der starken Ähnlichkeit des Isoenzymmusters verschiedener Organe. Klinisch von Bedeutung ist insbesondere die starke Ähnlichkeit der Isoenzymmuster des Herzmuskels, der Erythrozyten und der Niere. Dementsprechend überschneiden sich auch die im Serum auftretenden Isoenzymmuster bei Erkrankungen dieser Organe, soweit sie mit einer Fermentausschwemmung einhergehen. Dadurch können selbstverständlich sehr ähnliche Iso-

enzymmuster bei klinisch weit divergierenden Diagnosen im Serum auftreten. — Derartige Spektren sind in Abbildung 2 aufgeführt.

Eine Differenzierung dieser Muster ergibt sich in den meisten Fällen eindeutig aus der klinischen Diagnostik. Wir konnten jedoch insbesondere bei Intoxikationen Erhöhungen der Gesamt-LDH-Aktivität beobachten, die durch Schädigung aller oben angeführten Organe hätten entstanden sein können. So auch in dem abgebildeten Fall einer akuten Anurie nach Chrom-Intoxikation. Aufgrund der eingehenden klinischen Diagnostik, die keinen Anhalt für eine hämolytische oder cardiale Komponente bot, mußten wir hier das Nierengewebe als im Vordergrund stehenden Ausgangspunkt der LDH-Erhöhung ansehen. Nach Abklingen der Anurie ergab sich biotisch der Befund einer interstitiellen Nephritis.

Völlig unklar war anfänglich die Deutung des an fünfter Stelle aufgeführten Spektrums. Es handelte sich dabei um das Serum eines Patienten mit Bronchialkarzinom. Ein erythrozytärer oder nephrogener Ursprung der LDH-I-Erhöhung war aufgrund der vorliegenden klinischen Daten auszuschließen. Auch für eine Myocardbeteiligung lag kein Hinweis vor. Erst autopsisch ergab sich die Klärung des Befundes durch eine neoplastische Durchwucherung des Myocards. Einen gleich gelagerten Fall haben auch DUBACH und VARIOKOJIS (8) und jetzt auch ORELLI und DUBACH (9) beschrieben. Bei ihnen handelte es sich ebenfalls um eine neoplastische Durchsetzung des Myocards, ausgehend von Bronchialkarzinomen.

Mit der gleichen oben beschriebenen Methodik haben wir auch Isoenzym-Untersuchungen in Erguß-Material vorgenommen. Eine Einengung des Ausgangsmaterials zur Untersuchung ist nicht erforderlich. — Von dem Arbeitskreis um RICHTERICH war in einer schon oben erwähnten Arbeit (7) die Möglichkeit mitgeteilt worden, durch Isoenzym-Analysen die benigne oder maligne Ätiologie eines Ergusses feststellen zu können. Ihr Untersuchungsmaterial bestand aus 30 Fällen. Die *maligne* Ätiologie eines Ergusses glaubten sie unter 3 Voraussetzungen annehmen zu können:

1. Die gamma-LDH liegt im Erguß in höherer Konzentration als im Serum vor.
2. Die gamma-LDH beträgt mehr als 80 IE.
3. Die gamma-LDH macht prozentual mehr als 30% der Gesamtaktivität aus.

Methodisch benutzten sie die Auftrennung im Stärkeblock mit anschließender Elution. Sie gewannen dabei 4 LDH-Fractionen. Um vergleichbare Werte zu erhalten, muß bei Anwendung des von uns benutzten Verfahrens die Summe der LDH-IV- und LDH-V-Fraktion der von ihnen erwähnten „gamma-LDH“ gleichgesetzt werden. — Unter dieser Voraussetzung stimmen die in ihrer Arbeit veröffentlichten Befunde über Serum-LDH-Auftrennungen im wesentlichen mit den von WROBLEWSKI, WIEME und von uns gefundenen überein. Dies trifft jedoch nicht im gleichen Maße für die Exsudatauftrennung zu. Es wurden von uns 19 Pleura-Exsudate untersucht. Davon 11 benigner, 8 maligner Ätiologie. Natürlich ist die Zahl der Untersuchungen zu klein, um aus ihnen bindende Schlüsse ziehen zu können. Es konnte jedoch entgegen den RICHTERICH'schen Untersuchungsergebnissen beobachtet werden, daß auch in malignen Ergüssen ein LDH-Isoenzym-Muster *ohne* Betonung der IV. und V. Fraktion auftreten kann (s. Abb. 3, Beispiel 4 u. 5).

Demgegenüber war andererseits auch in *benignen* Exsudaten ein Muster mit Betonung dieser LDH-Fraktion nachzuweisen (s. Abb. 4, Beispiel 2 und 3). In Beispiel 3 und 4 war bei dem gleichen Patienten vermutlich infolge der Therapie eine Wandlung des Isoenzym-Musters zu beobachten. Es handelte sich um eine *Pleuritis tubercu-*

culosa, die zwischenzeitlich mit Corticoiden intrapleural behandelt worden war. Schon bei flüchtiger Betrachtung fällt die Verschiedenheit der einzelnen Isoenzym-Muster in der Gruppe der malignen Exsudate auf. Bei klinisch gleichem Prozeß (Bronchialkarzinom) findet sich einmal (Beispiel 1) eine starke Betonung der kathodisch wandernden Isoenzym-Fraktion (35%), ohne daß eine Auftrennung in die IV. und V. LDH-Fraktion möglich wäre, ein andermal (Beispiel 2) ein Anstieg der LDH-IV-Fraktion auf 73% bei fehlender LDH-III-Fraktion. Schließlich ist auch das Auftreten von nur 3 kaum den üblichen Mustern zuzuordnenden Fraktionen im Pleuraerguß eines Plasmocytomkranken bemerkenswert. Daß auch ein annähernd normales Verteilungsmuster wie in Beispiel 4 im Pleuraerguß bei Bronchialkarzinomen auftreten kann, wurde schon erwähnt.

Eine sichere Differenzierung der Erguß-Ätiologie war uns in Übereinstimmung mit DUBACH und VARIOKOJIS (8) sowie WOERNER (10) anhand der RICHTERICH'schen Kriterien 2 und 3 nicht möglich. Leider liegen aus beiden erwähnten Arbeiten keine Angaben zu dem von RICHTERICH am stärksten bewerteten Kriterium 1 vor. In den von uns analysierten 10 Fällen mit benignen entzündlichen Ergüssen ließ sich jedoch zweimal auch dieses Malignitätszeichen als positiv nachweisen. — Es muß der Analyse eines größeren Untersuchungsmaterials vorbehalten bleiben, zu klären, inwieweit die histologische bzw. histochemische Differenzierung eines Tumors, seine Wachstumsausbreitung, insbesondere die Kommunikation mit dem Erguß sowie nicht zuletzt die Therapie Einfluß auf die Gestaltung des Isoenzym-Spektrums nimmt.

Abschließend sei ein Vergleich der Methoden zwischen der LDH-Isoenzymbestimmung mit Hilfe der Hitzeinaktivierung — wie sie hauptsächlich von DUBACH angewendet wird — und der hier beschriebenen Agar-Gel-Elektrophorese angeführt. Wir haben dabei das LDH-reiche Serum eines Patienten mit einem in die Leber metastasierenden Melanom ausgewählt, um die hitzeinstabilen LDH-Fractionen IV und V in genügend hoher Aktivität nachweisen zu können. Das Serum wurde entsprechend den Angaben DUBACH's (8) 30 Min. in Wasser verschiedener Temperatur inkubiert. — Der

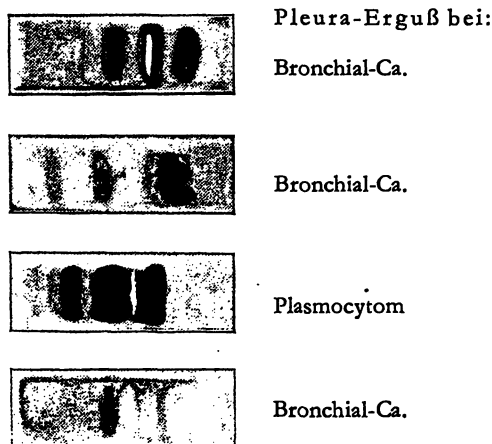


Abb. 3

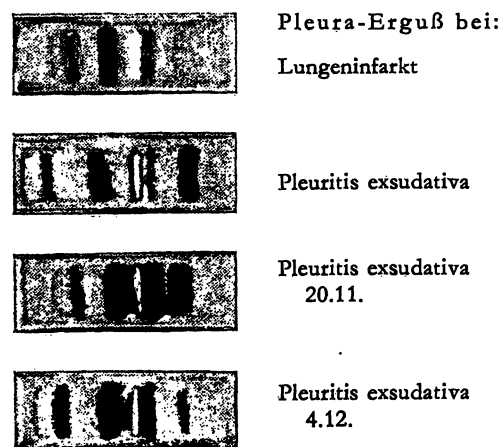


Abb. 4

Tab. 2

	Gesamt-Aktivität (IE)	Aktivitätsabnahme (%)	Rel.% der LDH-Fractionen					LDH — I E				
			I	II	III	IV	V	I	II	III	IV	V
Ausgangsaktivität	318		17	33	15	30	5	54	105	48	95	16
40°	286	10	18	44	15	19	4	52	126	43	54	11
50°	188	41	24	47	15	10	4	45	88	28	19	8
57°	88	73	28	66	6	—	—	25	58	5	—	—
65°	56	82	44	56	—	—	—	25	31	—	—	—

Gesamtaktivitätsverlust und seine Verteilung auf die einzelnen LDH-Fractionen ist in Tabelle 2 dargestellt. Das Ergebnis beider Untersuchungen wäre das gleiche: *Hitzelabilitätsprüfung*: $SLDH_1:SLDH_5 = 18:72 =$ starkes Überwiegen der hitzestabilen Fraktion (Aktivität des Testwertes bei Zimmertemperatur abzüglich des Testwertes bei 57°).

Elektrophoretisch: Betonung der kathodisch wandernden LDH-Fraktion IV, die 30% der Gesamtaktivität ausmacht (= 95 IE).

Bei Anwendung beider Untersuchungsmethoden müßte daher der Verdacht auf eine Hepatopathie ausgesprochen werden.

Während das Untersuchungsergebnis mit Hilfe der Hitzelabilitätsprüfung damit erschöpft wäre, ist elektrophoretisch das starke Hervortreten gerade der LDH-IV-Fraktion auffallend. Bei Leberaffektionen fanden wir häufig beide langsam wandernden Fraktionen erhöht.

War nur eine dieser Fraktionen betroffen, dann ist es in der Regel die LDH-V-Fraktion. Der untersuchte Fall bietet somit bei Anwendung der elektrophoretischen Methodik ein durchaus auffallendes Isoenzym-Muster. Mit den Einschränkungen, die sich aus einer einmaligen Untersuchung zwangsläufig ergeben, müssen wir annehmen, daß eine Gleichsetzung hitzelabiler bzw. hitzestabiler Fraktionen mit Isoenzym-Fractionen auf elektrophoretischer Basis *nicht* möglich ist. Es sind zwar die LDH-Fractionen III, IV und V durch die Temperatureinwirkung besonders betroffen, gleichzeitig kommt es jedoch auch zu einer Aktivitätsabnahme in allen anderen Fraktionen. Insbesondere ist bei 57° nicht nur eine Inaktivierung der IV. und V., sondern auch eines erheblichen Teils der III. Fraktion festzustellen. Daneben treten gleichzeitig Aktivitätsverluste in den beiden ersten Fraktionen auf, wobei jedoch deren Relation zueinander gewahrt bleibt.

Literatur

1. MEISTER, H., J. biol. Chemistry 184, 117 (1950). — 2. VESELL, E. S. und A. G. BEARN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 94, 96 (1957). — 3. WIELAND, T., G. PFLEIDERER, I. HAUPT und W. WOERNER, Biochem. Z., 332, 1 (1959?). — 4. WIELAND, T. und G. PFLEIDERER, Ann. N. Y. Acad. Sc. 94, 691 (1961). — 5. WIELAND, T. und G. PFLEIDERER, Advances Encymol. N. Y. 25, 329 (1963). — 6. ZUPPINGER, K., R. RICHTERICH und E. ROSSI, Schweiz. med. Wschr. 92, 169 und 198 (1962). — 7. RICHTERICH, R., J. LOCHER, K. ZUPPINGER und E. ROSSI, Schweiz. med. Wschr. 92, 918 (1962). — 8. DUBACH, U. C. und D. VARIKOJIS, Schweiz. med. Wschr. 93, 1196 (1963). — 9. V. ORELLI, A. und U. C. DUBACH, Klin. Wschr. 42, 58 (1964). — 10. WÖRNER, W., Med. Klin. 59, 11 (1964). — 11. HESS, B., Klin. Wschr. 38, 1080 (1960). — 12. HESS, B., Enzyme im Blutplasma, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962). — 13. HESS, B., Verh. Dtsch. Ges. inn. Med., 70

(1964). — 14. BÄR, U., E. SCHMIDT und F. W. SCHMIDT, Klin. Wschr. 41, 977 (1963). — 15. VAN DER HELM, H. J., Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 7, 124 (1962). — 16. WIEME, R. J. und V. MAERCKE, Ann. N. Y. Acad. Sc. 94, 898 (1961). — 17. WIEME, R. J. und L. DEMEULENAERE, Acta gastro-enterol. Belg. 22, 69 (1959). — 18. KAMARY, J. und Z. ZAZVORKA, Sci. Tools (Stockholm) 10, 2 (1963). — 19. WIEME, R. J., M. VAN SANDE, D. KARCHER, A. LOEWENTHAL und VAN DER HELM, Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 7, 750 (1962). — 20. HILL, B. R., Cancer Res., 21, 271 (1961). — 21. BLANCHAE, M. C., Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 6, 272 (1961). — 22. MARKERT, C. L. und H. URSprung, Development. Biol. 5, 3 (1962). — 23. DIUGUARDI, N., A. AGOSTINI und G. FIORELLI, Encymol. biol. Clin., 2, 116 (1962/63).

Dr. Chr. Fröhlich
Med. Universitätsklinik
74 Tübingen